



PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **2001149076 A**(43) Date of publication of application: **05.06.01****(54) METHOD FOR JUDGING EFFECTIVENESS OF INTERFERON TREATMENT IN CHRONIC HEPATITIS C PATIENT**

(57) Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a method for judging effectiveness of interferon treatment by elucidating a relation between expression of IFN receptor gene in a hepatitis C patient infected with

HCV-1b and effectiveness of interferon treatment.

SOLUTION: This method for judging effectiveness of interferon treatment in a chronic hepatitis C patient comprises detection of presence of expression of IFN- α receptor (IFNAR1) and IFN- α/β receptor (IFNAR2) in a patient liver.

COPYRIGHT: (C)2001,JPO

(51) Int. Cl

C12N 15/09
C07K 14/555
C12Q 1/68
G01N 33/15
G01N 33/50
G01N 33/53
G01N 33/576

(21) Application number: **11332704**(22) Date of filing: **24.11.99**

(71) Applicant: **NICHIKO PHARMACEUTICAL CO LTD OKUDA KENJI TANAKA KATSUAKI IKEDA MASANORISEKIHARA HISAHICO**

(72) Inventor: **MORITA KATSUMI
 SAITO SATOSHI
 KITAMURA TAKEHIKO
 KOBATAKE
 FUJII TAKAHITO
 NUMATA KAZUJI
 TANAKA KATSUAKI
 SEKIHARA HISAHICO**

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2001-149076

(P2001-149076A)

(43) 公開日 平成13年6月5日(2001.6.5)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テーマコード*(参考)
C 1 2 N 15/09	Z N A	C 0 7 K 14/555	2 G 0 4 5
C 0 7 K 14/555		C 1 2 Q 1/68	A 4 B 0 2 4
C 1 2 Q 1/68		G 0 1 N 33/15	Z 4 B 0 6 3
G 0 1 N 33/15		33/50	Z 4 H 0 4 5
33/50		33/53	P
審査請求 未請求 請求項の数 7 O L (全 12 頁) 最終頁に続く			
(21) 出願番号	特願平11-332704	(71) 出願人	592073695 日本医薬品工業株式会社 富山県富山市総曲輪 1 丁目 6 番 21
(22) 出願日	平成11年11月24日(1999. 11. 24)	(71) 出願人	593212758 奥田 研爾 神奈川県横浜市磯子区洋光台 4 - 6 - 35
特許法第30条第 1 項適用申請有り		(71) 出願人	599164927 田中 克明 東京都杉並区宮前 5 - 13 - 21
		(74) 代理人	100096219 弁理士 今村 正純 (外 2 名)
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 慢性C型肝炎患者におけるインターフェロン治療の有効性の判定方法

(57) 【要約】

【課題】 HCV-1 bに感染したC型肝炎患者におけるIFN受容体遺伝子の発現とインターフェロン治療の有効性との関係について解明し、インターフェロン治療の有効性の判定方法を提供すること。

【解決手段】 患者の肝臓におけるIFN- α 受容体(IFNAR1)およびIFN- α/β 受容体(IFNAR2)の発現の有無を検出することを含む、慢性C型肝炎患者におけるインターフェロン治療の有効性の判定方法。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 患者の肝臓におけるIFN- α 受容体(IFNAR1)およびIFN- α/β 受容体(IFNAR2)の発現の有無を検出することを含む、慢性C型肝炎患者におけるインターフェロン治療の有効性の判定方法。

【請求項2】 慢性C型肝炎患者がC型肝炎ウイルス遺伝子型1bを有する、請求項1に記載の判定方法。

【請求項3】 患者の肝臓におけるIFN- α 受容体(IFNAR1)およびIFN- α/β 受容体(IFNAR2)の発現の有無を検出し、上記受容体の両方を発現している患者についてはインターフェロン治療が有効であると判定する、請求項1または2に記載の判定方法。

【請求項4】 患者の肝臓におけるIFN- α 受容体(IFNAR1)およびIFN- α/β 受容体(IFNAR2)の発現の有無をRT-PCR法で検出する、請求項1から3の何れか1項に記載の方法。

【請求項5】 (1) IFN- α 受容体(IFNAR1)遺伝子を増幅するためのプライマー、(2) IFN- α/β 受容体(IFNAR2)遺伝子を増幅するためのプライマー、(3) 逆転写酵素、(4) Taq DNAポリメラーゼおよび(5) dNTPs混合物を含む、請求項1から4の何れか1項に記載の方法に用いるための判定用キット。

【請求項6】 請求項1から4の何れか1項に記載の方法によりインターフェロン治療が有効であると判定された患者に投与するためのインターフェロン。

【請求項7】 IFN- α 受容体(IFNAR1)および/またはIFN- α/β 受容体(IFNAR2)をコードするDNAを含む、慢性C型肝炎患者におけるインターフェロン治療の有効性を高めるための発現ベクター。

【発明の詳細な説明】**【0001】**

【発明の属する技術分野】 本発明は、慢性C型肝炎患者におけるインターフェロン治療の有効性の判定方法、より詳細には、慢性C型肝炎患者の肝臓におけるインターフェロン受容体の発現の有無を検出することによるインターフェロン治療の有効性の判定方法に関する。

【0002】

【従来の技術】 C型肝炎はC型肝炎ウイルス(HCV)の感染によって肝臓が炎症をおこす病気である。このウイルスは血液を介して感染し、ほとんどの場合慢性肝炎になり、放置すると肝硬変を経て肝細胞がんになる確率が高い。慢性肝炎の状態では生命に危険はなく、継続的な治療を要する点を除けば、健康人と同じ生活ができるが、肝細胞がんが発生したり、肝硬変が進行して肝不全を引き起こすようになると生命の危険に瀕する。従って、C型肝炎の治療では、このような状態を回避するこ

とが目標となる。C型肝炎の治療では、肝臓の炎症の原因になるウイルスを排除することが望ましいが、それが不可能な場合は肝臓の炎症を押さえて病気の進行をとどめることが必要となる。

【0003】 慢性C型肝炎の治療の一つとしてインターフェロンが使用されている。慢性C型肝炎の約50%の患者はインターフェロン治療に応答するものの、そのうち約半数の患者では肝機能の再燃を認める。インターフェロンが治療効果を示すか否かの要因の一つとして、ウイルスの遺伝子型がある。C型肝炎ウイルスは1型から6型および最低50のサブタイプがあり、日本に一番多いのは1b型である。しかしながら、1b型ウイルスはインターフェロンが最も効果を示さないウイルスであると考えられている。また、1b型ウイルスでもウイルス量が少ない場合には比較的インターフェロンによる治療効果がみられるが、ウイルス量が多い場合には治療効果がなくなる傾向がある。また、一般的には肝臓の病変が進むほどインターフェロンの治療効果がなくなる傾向も見られる。

【0004】 また、インターフェロン分子自体が直接的に抗ウイルス作用を発揮するのではなく、インターフェロンの作用は特異的細胞表面受容体との相互作用によって仲介されるものと考えられている。肝臓におけるインターフェロン(IFN)受容体遺伝子の発現の有無が、C型肝炎ウイルス感染患者におけるインターフェロン治療の有効性と相関性を有する可能性があることは既示唆されている。最近では、本発明者らにより、C型肝炎ウイルス(HCV)-2aまたはHCV-2bに感染した患者において、肝臓におけるIFN受容体遺伝子の発現がIFNの有効性と有意に相関していることが報告された(Morita他、J.Clin.Gastroenterol, 1998, 26:135-140)。

【0005】 しかしながら、HCV-1bに感染した患者を含む慢性C型肝炎患者において、これらの予測用の指標がIFN治療の有効性の正確な判定にどの程度寄与するのか、あるいは肝臓におけるIFN受容体遺伝子の発現とIFNの有効性とは互いにどのように相関しているのかは依然として不明なままである。また、HCV-2aまたはHCV-2bに感染した患者はC型肝炎患者の中でもマイナーな群であるため、これらの患者においてIFN受容体遺伝子の発現とIFNの有効性との間に相関関係が存在していることが判明したとしても、このような相関関係がC型肝炎患者の他の群においても認められるとは限らない。特に、C型肝炎患者の最もメジャーな群であり(日本のHCVキャリアの約70%がHCV1b型である)、最もIFN抵抗性が高く、また肝細胞がんへの進展率も有意に高いHCV-1bに感染した患者におけるIFN受容体遺伝子の発現とIFN治療の有効性との関係についてはこれまでに報告されていない。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、HCV-1bに感染したC型肝炎患者におけるIFN受容体遺伝子の発現とインターフェロン治療の有効性との関係について解明し、インターフェロン治療の有効性の判定方法を提供することを解決すべき課題とした。

【0007】

【課題を解決するための手段】本発明者らは上記課題を解決するために鋭意研究した結果、HCV-1bに感染した患者の約70%においてはIFNAR1とIFNAR2の何れか片方または両方が発現していないこと、そしてこれらの患者では、インターフェロンの有効性が有意に低いことを見出し、本発明を完成するに至った。即ち、本発明によれば、患者の肝臓におけるIFN- α 受容体(IFNAR1)およびIFN- α/β 受容体(IFNAR2)の発現の有無を検出することを含む、慢性C型肝炎患者におけるインターフェロン治療の有効性の判定方法が提供される。

【0008】本発明の判定方法の一つの態様によれば、慢性C型肝炎患者の多くはC型肝炎ウイルス遺伝子型1bを有する。本発明の判定方法の一つの態様によれば、患者の肝臓におけるIFN- α 受容体(IFNAR1)およびIFN- α/β 受容体(IFNAR2)の発現の有無を検出し、上記受容体の両方を発現している患者についてはインターフェロン治療が有効であると判断される。本発明の判定方法の一つの態様によれば、患者の肝臓におけるIFN- α 受容体(IFNAR1)およびIFN- α/β 受容体(IFNAR2)の発現の有無はRT-PCR法で検出される。

【0009】本発明の別の側面によれば、(1)IFN- α 受容体(IFNAR1)遺伝子を増幅するためのプライマー、(2)IFN- α/β 受容体(IFNAR2)遺伝子を増幅するためのプライマー、(3)逆転写酵素、(4)Ta q DNAポリメラーゼおよび(5)dNTPs混合物を含む、本発明の判定方法に用いるための判定用キットが提供される。本発明のさらに別の側面によれば、本発明の方法によりインターフェロン治療が有効であると判定された患者に投与するためのインターフェロンが提供される。本発明のさらに別の側面によれば、IFN- α 受容体(IFNAR1)および/またはIFN- α/β 受容体(IFNAR2)をコードするDNAを含む、慢性C型肝炎患者におけるインターフェロン治療の有効性を高めるための発現ベクターが提供される。

【0010】

【発明の実施の形態】以下、本発明の実施態様および実施方法について詳細に説明する。本発明は、患者の肝臓におけるIFN- α 受容体(IFNAR1)およびIFN- α/β 受容体(IFNAR2)の発現の有無を検出することを含む、慢性C型肝炎患者におけるインターフ

ェロン治療の有効性の判定方法に関するものである。

【0011】C型肝炎とは、C型肝炎ウイルスの感染により生じる肝炎であり、身体的症状としては、軽度から重症の傾眠状態、食欲不振、悪心・嘔吐、腹部・右季肋部痛、発熱、関節痛、皮膚および眼の黄染、尿の着色(暗褐色)などが見られ、精神的症状としては、集中力欠乏、気分の動揺、いらいら、うつ病などが見られる疾患である。臨床的特徴としては、約1/3が急性肝炎で発症するが、大部分は潜在的に進行する。本発明の判定方法の対象となる患者は好ましくは、C型肝炎ウイルス遺伝子型1bを有する患者である。C型肝炎ウイルス遺伝子型1bは、C型肝炎ウイルスの複数ある遺伝子型の一つであり、その構造は公知である(加藤ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:9524-9528, 1990)。

【0012】インターフェロンは、生体内に微量存在する生理活性タンパク質の一つであり、1986年に白血病を治療するために認可を受け、遺伝子工学的に大量生産されるようになった。また、インターフェロンは1991年にFDA食品医薬品局よりC型肝炎への使用が認められた。 α -インターフェロン製剤は、C型肝炎に対する効果的な治療法の一つである。例えば、C型肝炎治療を目的として週3回300万単位のインターフェロンを投与した場合に、約25%の治療効果があるという報告がある。しかしながら、インターフェロン投与には副作用を伴う場合もあり、またインターフェロンは比較的高価な薬剤である。従って、治療効果を示さない患者には投与しないことが好ましい。本発明は、このようなインターフェロン治療の効果の有無をインターフェロン投与の前に予測/判定する方法を提供するものである。また、本発明は、本発明の判定方法でインターフェロン治療が有効であると判定された患者に投与するためのインターフェロンに関する。ここで言うインターフェロンとは、例えば、上記したように既に臨床使用されているインターフェロン製剤を言うが、それらに限定されるわけではない。

【0013】本発明の方法は、患者の肝臓におけるIFN- α 受容体(IFNAR1)およびIFN- α/β 受容体(IFNAR2)の発現の有無を検出するものである。IFN- α 受容体(IFNAR1)およびIFN- α/β 受容体(IFNAR2)は、インターフェロンの受容体の2つのサブユニットであり、その構造は既知である(Uze他、1990, Cell, 60, 225-234)。

【0014】インターフェロン受容体の検出の方法には限定されず、任意の方法で行うことができ、例えば、ノザンブロット法、RT-PCR法などによってmRNAレベルで検出してもよいし、インターフェロン受容体に対する抗体などを用いたウエスタンブロット法、免疫沈降法などによって蛋白質レベルで検出してもよい。操作性の観点からは、mRNAレベルで検出する方法が好ましく、特にRT-PCR法で検出する方法が好

ましい。

【0015】RT-PCR法は、検出すべきRNAを含む試料に、逆転写酵素（例えば、MMLV逆転写酵素）、dNTPmixture（dATP、dCTP、dGTP、dTTP）、プライマー、緩衝液などを加えて逆転写反応を行った後に、PCR反応を行い、検出すべきRNAから逆転写されたcDNAを増幅して検出する方法である。RT-PCR法自体の実験手順は当業者に周知である。本発明では、IFN- α 受容体（IFNAR1）およびIFN- α/β 受容体（IFNAR2）の発現の有無の検出を目的とするため、これら受容体の遺伝子の配列に基づいて設計したプライマーを使用することができる。

【0016】本発明は、（1）IFN- α 受容体（IFNAR1）遺伝子を増幅するためのプライマー、（2）IFN- α/β 受容体（IFNAR2）遺伝子を増幅するためのプライマー、（3）逆転写酵素、（4）Taq DNAポリメラーゼおよび（5）dNTPs混合物を含む、本発明の判定方法に用いるための判定用キットにも関する。IFN- α 受容体（IFNAR1）遺伝子を増幅するためのプライマーおよびIFN- α/β 受容体（IFNAR2）遺伝子を増幅するためのプライマーとしては、上記したようにこれら受容体の遺伝子の配列に基づいて設計したプライマーを使用することができ、例えば、配列表の配列番号1から8に記載の配列を有するプライマーを使用することができる。また、キットには、RT-PCRを行うために必要な他の試薬（例えば、緩衝液および精製水など）を適宜含めることができる。また、肝臓試料からRNAを回収するために必要な試薬などを含めてもよい。本発明によれば、IFN- α 受容体（IFNAR1）および/またはIFN- α/β 受容体（IFNAR2）をコードするDNAを含む、慢性C型肝炎患者におけるインターフェロン治療の有効性を高めるための発現ベクターも提供される。かかる発現ベクターは、IFN- α 受容体（IFNAR1）および/またはIFN- α/β 受容体（IFNAR2）をコードするDNAを生体内で発現できるものであればその種類は限定されず、通常は好適なプロモーター配列を含むものが使用される。以下の実施例により本発明をさらに具体的に説明するが、本発明は実施例によって限定されることはない。

【0017】

【実施例】（A）材料と方法

（1）患者集団

C型肝炎ウイルス（HCV）に感染した82人（51人の男性と31人の女性で、21歳から68歳で平均47歳）の慢性C型肝炎患者で試験を行った。患者は全て6カ月以上の期間を通じて異常なアラニントランスアミナーゼ（ALT）値を示し、肝生検により慢性肝炎であることが確認された。患者は全てアルコール又は薬物乱用

の経歴を有さず、代謝性疾患または自己免疫疾患の形跡もなく、コルチコステロイド、免疫抑制剤または抗ウイルス治療を以前に受けていない。

【0018】全患者に24週間IFN- α を投与した。600万単位の天然IFN- α （ヒトリンパ芽球インターフェロン、住友製薬株式会社）を75名の患者に筋肉内投与し、500万単位の天然IFN- α （ヒトリンパ芽球インターフェロン、大塚製薬株式会社）を7名の患者に投与した。最初の2週間は連日投与し、次いで、22週間に渡り週3回の割合で隔日投与とした。IFN治療の間、何れの患者も重大な副作用を示さず、IFN投与量も減少することなく維持できた。全患者について、IFN治療前に肝生検を行った。肝臓試料は液体窒素中で直ちに凍結し、分析まで-80℃で保存した。血清試料を使用して、HCVの遺伝子型およびHCV濃度を既報の通り測定した（Morita他、J.Clin.Gastroenterol, 1998, 26(29)135-140）。IFN治療に対する生化学的およびウイルス学的応答を治療期間の終了時（24週目：初期応答）と、追跡期間の終了時（48週目：持続応答）に評価した。生化学的寛解は血清ALT濃度が正常範囲内として定義し、ウイルス学的寛解はRT-PCR法で測定した血清HCV RNAが陰性となった場合と定義した。

【0019】（2）肝臓IFN受容体遺伝子の発現の測定

予備処理肝臓試料を使用して、1型IFN受容体の2つのサブユニット[IFNAR1（IFN- α 受容体）、およびIFNAR2（IFN- α/β 受容体）]（Uze他、1990, Cell, 60, 225-234）を既報の通りRT-nested PCR法により測定した。IFNAR1用のプライマー配列としては、外側センス：5'-AGTGTATGTGGGCTTTGGATGGTTTAAGC-3'（ヌクレオチド535-564：配列番号1）、外側アンチセンス5'-TCTGGCTTTCACACAATATACAGTCAGTGG-3'（ヌクレオチド1270-1299：配列番号2）、内側センス5'-GACCTTCAAGTTCAGTGGCTCCAGCC-3'（ヌクレオチド843-870：配列番号3）、および内側アンチセンス5'-GGATCACAGCGTGTTTCCAGACTG-3'（ヌクレオチド1141-1165：配列番号4）を使用した。IFNAR2用のプライマー配列としては、外側センス：5'-GCTTTGAGCGAGAATGCCT-3'（ヌクレオチド329-348：配列番号5）、外側アンチセンス5'-CCCTCTGACTGTTC TTCAATG-3'（ヌクレオチド833-853：配列番号6）、内側センス5'-GAAGGTGGTTAAGAACTGTGC-3'（ヌクレオチド563-583：配列番号7）、および内側アンチセンス5'-CCCGCTGAATCCTTCTAGGACGG-3'（ヌクレオチド649-671：配列番号8）を使用した。PCR増幅は、94℃で1分間の変性、55℃で45秒のアニーリングおよび72℃で2分間の伸長を35サイクル行った。グリセロール-3-リン酸デヒ

ドロゲナーゼ (G3PDH) mRNAを使用して肝臓試料からのRNA抽出の可否を確認し、RT-PCR分析のコントロールとした。最終PCR産物を2%アガロースゲル上で電気泳動し、バンドをエチジウムブロミド染色により可視化した。

【0020】(3) NS5A₂₂₀₀₋₂₂₄₈遺伝子のヌクレオチド配列の決定

HCV-1bに感染した患者からの血清試料を用いて、NS5A₂₂₀₀₋₂₂₄₈遺伝子のヌクレオチド配列の測定のために血清RNAを抽出した。ヌクレオチド6703-7320 (HCV-Jの配列に基づく番号 (Kato他, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 87:9524-9528)) をRT-nestedPCRによって増幅した。この領域のヌクレオチド配列を決定するために、ダイレクトシーケンスを自動DNA配列決定装置 (377 DNA配列決定装置、パーキンエルマーシートス) で行った。NS5A₂₂₀₀₋₂₂₄₈の得られたアミノ酸配列を、HCV-Jで同定されたNS5A₂₂₀₀₋₂₂₄₈の配列と比較した。

【0021】(4) 組織学的検査

組織学的分類を慢性肝炎のヨーロッパ分類により行った (Groote他, 1968, Lancet, 2:625-628)。組織学的活性を評価するために、組織学的活性インデックス (HAI) スコアを使用した (Knodell, 他, 1981, Hepatology, 1:431-436)。

【0022】(5) 統計分析

データは平均±SEで表示した。通常の統計分析はStudent's t 試験または χ^2 検定を使用した。血清ALT値の変化は、バリネの2式反復測定分析で評価した。IFN治療の有効性に関連する独立特性を決めるために記号論理回帰による多変量解析を行った。マルチプル記号論理回帰モデルは以下の解釈上の変数を用いて構築した: 年齢、性別 (女性=0、男性=1)、血清ALT濃度、HCV遺伝子型 (遺伝子型1b=0、遺伝子型非1b=1)、血清HCV RNA濃度、通常の組織学的診断 (慢性活性肝炎 (CAH) 2A=0、CAH 2B=1)、HAIスコア、および肝臓における受容体mRNA発現 (陰性=0、陽性=1)。データ分析はコンピュータープログラムSPSS (SPSSジャパン) を用いて行った。P値は全て両側検定であり、 $P < 0.05$ をもって統計的に有意であるとみなした。

【0023】(B) 結果

(1) IFN治療前の患者の臨床的特徴

被験患者の特徴を表1に示す。HCV-1bの確率は61% (82名中の50名) であり、HCV-非1b (HCV-2aまたは2b) の確率は39% (82名中の32名) であった。血清HCV RNA濃度および血清ALT値は各々 5.6 ± 0.1 log₁₀ コピー/ml および 100 ± 8.5 IU/l であった。

【0024】

【表1】

表1 IFN治療前の患者の臨床上的特徴

パラメータ	
患者の数	82
年齢 ^a	47 ± 1.4
性別(男性/女性)	31/51
ALT (IU/l) ^a	100 ± 8.5
遺伝子型	
1b	50
非-1b(2a又は2b)	32
HCV RNA濃度 ^{a, b}	5.6 ± 0.1
組織型	
CAH 2A	58
CAH 2B	24
HAI スコア	4.3 ± 0.3

^aデータは平均±SEを示す。

^bデータはlog₁₀として示される。(コピー数/ml 血清)

【0025】(2) 肝臓におけるIFNAR1およびIFNAR2のmRNAの発現

IFNAR1およびIFNAR2のmRNAを含有する肝臓試料中で、PCRは予想されたサイズのDNAのシングルバンド (各々、323および109bp) を生成した。IFNAR1mRNAの検出率は35% (82名中の29名) であり、IFNAR2mRNAの検出率は40% (82名中の33名) であった。IFNAR1およびIFNAR2のmRNAの両方が検出できた患者は25名であり、IFNAR1mRNAのみが検出できた

のは4名の患者であり、IFNAR2mRNAのみが検出できたのは8名の患者であった。IFNAR1とIFNAR2のmRNAのいずれも検出できなかった患者は45名であった。IFNAR1とIFNAR2の両方のRNAが発現する確率 (これは、IFN受容体mRNA陽性と定義される) は、30% (82名中の25名) であり、IFNAR1とIFNAR2の何れかまたは両方のRNAが発現しない確率 (これは、IFN受容体mRNA陰性と定義される) は、70% (82名中の57名) であった。

【0026】(3) IFN治療に対する初期(治療の終了時)および持続(追跡期間の終了時)応答と肝臓IFN受容体mRNA発現

IFN治療の終了時に、52名(63%)の患者が、生化学的寛解状態にあり、38名(46%)の患者がウイルス学的寛解状態にあった(表2)。IFN受容体mRNA陽性群では患者全て(100%)、そしてIFN受容体mRNA陰性群では27名の患者(47%)が生化学的寛解状態にあり、この差は有意であった($P < 0.0001$)。ウイルス学的寛解は、IFN受容体mRNA陽性群では患者全て(100%)において、そしてIFN受容体mRNA陰性群では13名の患者(23%)において見られ、この差も有意であった($P < 0.0001$)。追跡期間の終了時では、38名(48%)の患

者が、生化学的寛解状態にあり、26名(32%)の患者がウイルス学的寛解状態にあった。IFN受容体mRNA陽性群では21名の患者(84%)が生化学的寛解状態にあり、19名の患者(76%)がウイルス学的寛解状態にあった。これに対し、IFN受容体mRNA陰性群では17名の患者(30%)のみが生物学的寛解状態にあり、7名の患者(12%)のみがウイルス学的寛解状態にあった。追跡期間の終了時に生化学的またはウイルス学的寛解を示す患者の割合は、IFN受容体mRNA陽性群とIFN受容体mRNA陰性群との間では有意の差を認めた(共に $P < 0.0001$)。

【0027】

【表2】

表2 肝組織中IFN受容体mRNA発現の有無によるIFN治療後の初期(治療終了時)及び持続(追跡終了時)応答

	IFN受容体mRNA(%)		Total(%)	P*
	陽性	陰性		
初期応答				
生化学的	25/25(100)	27/57(47)	52/82(69)	<0.0001
ウイルス学的	25/25(100)	13/57(23)	38/82(46)	<0.0001
持続応答				
生化学的	21/25 (84)	17/57(30)	38/82(48)	<0.0001
ウイルス学的	19/25 (76)	7/57(12)	26/82(32)	<0.0001

*Chi-squared test

【0028】IFN受容体mRNA陽性患者は、IFN受容体mRNA陰性患者(57名中の18名:32%)よりも高い確率でHCV非1bに感染する傾向があった(25名中の14名:56%)。しかし、これら2群の間に有意差はなかった。血清HCV RNA濃度に関しては、IFN受容体mRNA陽性患者($5.3 \pm 0.2 \log_{10}$ コピー/ml)および陰性患者($5.7 \pm 0.1 \log_{10}$ コピー/ml)の間で有意差はなかった。IFN受容体mRNA陽性患者(4.4 ± 0.5)および陰性患者(4.3 ± 0.3)の間で、HAIスコアに有意差はなかった。多変量解析により、IFN受容体mRNA発現に有意に影響を及ぼす因子は存在しないことが判明した。図1は、IFN受容体mRNAが陽性および陰性の患者群における血清ALT値の変化率の推移を示す。血清ALT値は、IFN受容体mRNA陽性患者の場合、陰性の患者と比較して、基底レベルから有意に減少した($P = 0.0036$)。

【0029】(4) IFN治療に対する応答を予測する

因子

表3は、IFNに対する生化学的またはウイルス学的な持続寛解(治療効果)に関与する単変量解析の結果を示す。上記両応答は、IFN受容体mRNAが陽性であること、遺伝子型が非HCV-1bであること、および血清HCV RNA量が有意に治療効果に寄与する因子となった。次に多変量解析を使用して、IFNに対する治療効果に寄与している可能性がある各変数因子について評価した(表4)。このモデルでは、IFN受容体mRNAが陽性であることと、HCV-1bが存在しないことが、IFN治療の有効性を予測できる独立因子であること、さらにIFN受容体mRNA発現が最も効果的に治療効果に寄与していることが示された。年齢、性別、HCV RNA濃度、血清ALT値、組織学的状態、およびHAIスコアなどの他の臨床因子はIFN治療の有効性を予測できる独立因子ではなかった。

【0030】

【表3】

表3 単変量解析によるIFNに対する生化学的持続応答又はウイルス学的持続応答に関連する因子

変数 (association)	持続応答 (P)	
	生化学的	ウイルス学的
年齢	有意差なし	有意差なし
性別	有意差なし	有意差なし
ALT値	有意差なし	有意差なし
非HCV-1b	0.0106	<0.0001
HCV RNA量	0.0044	0.0007
組織学	有意差なし	有意差なし
HAISコア	有意差なし	有意差なし
IFN受容体mRNA(陽性)	<0.0001	<0.0001

【0031】

【表4】

表4 マルチプル記号論理学回帰分析を用いたIFN治療の有効性に寄与する因子の分析

変数	生化学的持続応答／ウイルス学的持続応答			
	観測値 ^a	SE	P	R統計 ^b
IFN受容体mRNA陽性	2.7225/5.3404	0.7561/1.4430	0.0003/0.0002	0.3112/0.3379
非HCV-1b	1.9731/3.6546	0.7454/3.6546	0.0081/0.0031	0.2103/0.2569
年齢	-0.0476/-0.0750	0.0255/0.0402	0.0618/0.0594	-0.1146/0.1232
HCV RNA量	-0.3332/-0.9823	0.3853/0.5854	0.3872/0.0994	0.0000/-0.0892

^a 部分回帰係数^b 本モデルに対する各変数の部分的寄与の程度を示す。R統計は-1から1の数値範囲となる。-1または+1は、最大寄与を示す。

【0032】 (5) HCV-1b患者におけるNS5A遺伝子変異とIFNに対する応答

HCV-1bに感染した患者におけるNS5A

2200-2248のアミノ酸配列およびIFN受容体mRNAの発現の有無を図2に示す。患者はNS5A遺伝子の変異の数によって3つのカテゴリーに分類した。26名の患者(56%)はアミノ酸変異を有さない野生型配列を有し、19名の患者(40%)は1~3個のアミノ酸変異を有する中間型を有し、2名の患者(4%)は4個以上のアミノ酸変異を有する変異型を有していた。しかし、NS5A2200-2248領域におけるアミノ酸変異の数については、ウイルス学的寛解を示す群と示さない群との間には有意差はなかった。NS5A2200-2248領域におけるアミノ酸置換の数とIFN受容体mRNA発現との関連については、IFN受容体mRNA陽性患者と陰性患者との間に有意差はなく、NS5A2200-2248領域におけるアミノ酸変異の数は血清HCV RNA値との関連もなかった。

【0033】 (6) HCVの各遺伝子型におけるIFN受容体mRNA発現とIFN応答との関連

初期ウイルス学的寛解および持続ウイルス学的寛解に寄与する、2つの予測因子(HCV遺伝子型と肝臓IFN受容体mRNA発現)との関係を表5に示す。IFN受容体mRNAの発現が陽性であれば、HCV-1b患者およびHCV-非1b患者の両方において、100%の陽性予測率で、IFN治療に対する初期ウイルス学的寛解を予測した。IFN受容体mRNAの発現が陽性であれば、遺伝子型非1bの患者については100%の陽性予測率でIFN治療に対する持続ウイルス学的寛解を予測したが、対照的に、遺伝子型1bの患者についてはIFN受容体mRNAの発現が陰性であれば97%の陰性予測率でIFN治療がウイルス学的に効果がないことを予測した。

【0034】

【表5】

表5 IFN応答*に寄与するHCV遺伝子型とIFN受容体mRNA発現の関係

HCV遺伝子型	IFN受容体mRNA	IFN治療への応答	
		ウイルス学的初期応答	ウイルス学的持続応答
1b	陽性	患者 11 名中、11 名 PPV=100%	患者 11 名中、5 名 PPV=45%
1b	陰性	患者 39 名中、6 名 NPV=85%	患者 39 名中、1 名 NPV=97%
非-1b	陽性	患者数 14 名中、14 名 PPV=100%	患者数 14 名中、14 名 PPV=100%
非-1b	陰性	患者数 18 名中、7 名 NPV=61%	患者数 18 名中、6 名 NPV=67%

*PPV(陽性予測率)=真の陽性/(真の陽性+偽の陽性)

NPV(陰性予測率)=真の陰性/(真の陰性+偽の陰性)

【0035】(7) 結果のまとめ

インターフェロン受容体は、IFNAR1および、IFNAR2の2つのサブユニットから構成されることが知られている。はじめにIFN治療前の慢性C型肝炎患者の肝組織よりRNAを抽出し、IFNAR1および、IFNAR2のmRNAをRT-PCR法で検出した。IFNAR1とIFNAR2のいずれも陽性のものをインターフェロン受容体mRNA陽性、いずれか一方のみ陽性が、両方とも陰性のものをインターフェロン受容体mRNA陰性とした。82人の慢性C型肝炎患者のうちインターフェロン受容体mRNA陽性のものが25人、インターフェロン受容体mRNA陰性の者が57人であった。両群をインターフェロン治療終了時(24週目)の時点で比較するとHCV RNA陰性化例は、インターフェロン受容体mRNA陽性群で25人(100%)、インターフェロン受容体mRNA陰性群で13人(23%)であった。さらに、インターフェロン治療終了後24週目の

時点ではHCV RNA陰性化例は、インターフェロン受容体mRNA陽性群で19人(76%)、インターフェロン受容体mRNA陰性群で7人(12%)であった。以上の結果より、インターフェロン受容体がインターフェロン治療の効果判定の予測に有用であることが判明した。

【0036】

【発明の効果】本発明により、慢性肝炎患者に対するインターフェロン治療の有効性を判断する方法が提供されることになり、治療の有効性がないと考えられる患者に対するインターフェロン投与を回避できるようになる。これは、医療経済上の観点から好ましく、またインターフェロン投与による無用な副作用を回避できるという利点もある。

【0037】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110>; Kenji Okuda et al

<120>; A method of predicting the effectiveness of interferon therapy in

patients with chronic hepatitis C

<130>; 99358M

<160>; 8

<210>; 1

<211>; 30

<212>; DNA

<213>; Artificial DNA

<400>; 1

agtgttatgt gggctttgga tggtttaagc 30

<210>; 2

<211>; 30

<212>; DNA

<213>; Artificial DNA

<400>; 2

tctggctttc acacaatata cagtcagtgg 30

<210>; 3

```

<;211>; 28
<;212>; DNA
<;213>; Artificial DNA
<;400>; 3
gacctttcaa gttcagtggc tccacgcc    28
<;210>; 4
<;211>; 25
<;212>; DNA
<;213>; Artificial DNA
<;400>; 4
ggatcacagg cgtgtttcca gactg    25
<;210>; 5
<;211>; 20
<;212>; DNA
<;213>; Artificial DNA
<;400>; 5
gcttttgagc gagaatgcct    20
<;210>; 6
<;211>; 21
<;212>; DNA
<;213>; Artificial DNA
<;400>; 6
ccctctgact gttcttcaat g    21
<;210>; 7
<;211>; 21
<;212>; DNA
<;213>; Artificial DNA
<;400>; 7
gaaggtggtt aagaactgtg c    21
<;210>; 8
<;211>; 23
<;212>; DNA
<;213>; Artificial DNA
<;400>; 8
cccgtgaat ccttctagga cgg    23

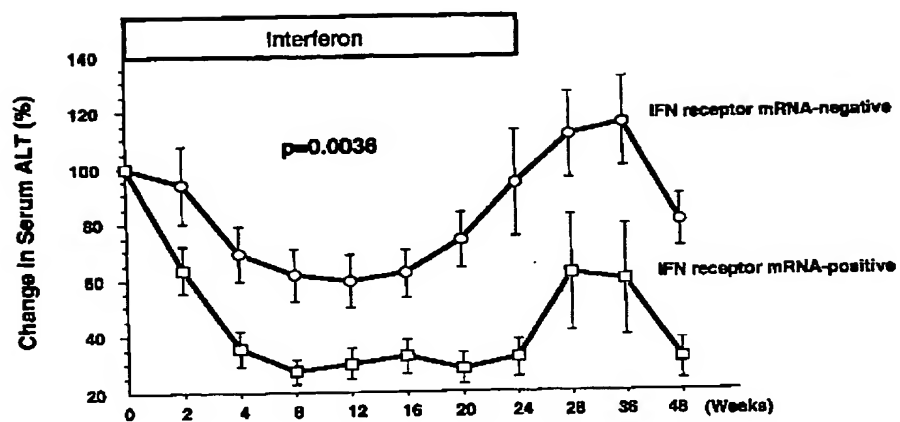
```

【図面の簡単な説明】

【図1】図1は、IFN受容体mRNAが陽性および陰性の患者群における血清ALT値の変化率の推移を示す。

【図2】図2は、HCV-1bに感染した患者におけるNS5A₂₂₀₀₋₂₂₄₈のアミノ酸配列およびIFN受容体mRNAの発現の有無を示す図である。

【図 1】



【図2】

A Responders	
HCV-J	IFN receptor mRNA
1 P S L K A T C T T H D S P D A D L I E A N L L W R Q E M G G N I T R V E S E N	Positive
2	Positive
3	Positive
4 E	Negative
5 R	Positive
6 R	Positive
B Nonresponders	
HCV-J	IFN receptor mRNA
1	Positive
2	Positive
3	Positive
4	Negative
5	Negative
6	Negative
7	Negative
8	Negative
9	Negative
10	Negative
11	Negative
12	Negative
13	Negative
14	Negative
15	Negative
16	Negative
17	Negative
18	Negative
19	Negative
20	Negative
21	Negative
22	Negative
23	Negative
24 R	Negative
25 R	Negative
26 R	Negative
27 R	Negative
28 R	Negative
29 R	Negative
30 R	Negative
31 C	Negative
32 V	Negative
33 V	Negative
34 D	Negative
35 Y - G	Negative
36 R R	Negative
37 V Q	Positive
38 T W	Negative
39 A L I	Positive
40 L G V H	Negative
41 V A A R V V Q	Negative

フロントページの続き

(51) Int. Cl. ⁷G 0 1 N 33/53
33/576

識別記号

F I

G 0 1 N 33/576
C 1 2 N 15/00

テーマコード(参考)

Z
Z N A A

(71) 出願人 599164938

池田 正徳

東京都目黒区上目黒5-31-10

(71) 出願人 599164949

関原 久彦

神奈川県横浜市青葉区美しが丘4-35-10

(72)発明者 森田 勝巳
神奈川県横浜市金沢区富岡西 3-3-11
フラッツドルチェ201号

(72)発明者 斎藤 聡
神奈川県横浜市金沢区西柴 4-1-3

(72)発明者 北村 剛彦
神奈川県横浜市磯子区杉田 3-10-12 ク
レール杉田204

(72)発明者 木場 崇剛
東京都足立区綾瀬 3-29-15 エステート
大塚101号

(72)発明者 藤井 隆人
神奈川県横浜市和泉町5625-27

(72)発明者 沼田 和司
神奈川県横浜市磯子区東町 7-7

(72)発明者 田中 克明
東京都杉並区宮前 5-13-21

(72)発明者 関原 久彦
神奈川県横浜市青葉区美しが丘 4-35-10

Fターム(参考) 2G045 AA25 CB26 DA36 DA77 FB01
4B024 AA01 AA11 BA63 CA04 DA06
EA04 GA11 HA01
4B063 QA01 QQ10 QQ43 QR32 QS25
4H045 AA10 AA11 BA10 CA40 DA51
EA20 EA53 FA74